

恒河猴 CG β 亚基 (rmCG β) DNA 在 HeLa 细胞中的表达及其对小鼠免疫反应的诱导*

陈云 刘喆 彭景樵** 张富春 陈幼珍 王宾

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 为了探讨人绒毛膜促性腺激素 hCG β 亚基 DNA 避孕疫苗的可能性, 以恒河猴绒毛膜促性腺激素 rmCG β 亚基全长氨基酸编码序列的 cDNA 片段构建了真核质粒表达载体 pCMV4-rmCG β 。通过脂质体转染的方法导入 HeLa 细胞, 采用 RT-PCR 方法检测 rmCG β 在 mRNA 水平上的表达。实验证明 HeLa 细胞在转染后 24 h 表达最强, 48 h 和 72 h 表达依次减弱; 利用 ELISA 方法检测了 pCMV4-rmCG β 在 HeLa 细胞中 rmCG β 蛋白的表达, rmCG β 蛋白主要以细胞内或膜结合的形式存在, 其含量可达 0.5 μ g/ 10^6 细胞。pCMV4-rmCG β DNA 免疫接种雌性 BALB/c 纯系小鼠, 能诱导小鼠产生强烈的体液免疫应答, 滴度最高可达 1:6 000 以上, 高滴度的免疫反应持续 10 周以上, 且免疫反应的强度与 pCMV4-rmCG β DNA 无剂量依赖关系。

关键词 恒河猴 CG β DNA 疫苗 HeLa 细胞 表达 免疫

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是人胎盘绒毛膜滋养层合体细胞分泌的一种糖蛋白激素, 在胚胎植入和妊娠维持中起关键作用, hCG 缺乏或不足均可使妊娠中断 (Morgan *et al.*, 1975; Darrell *et al.*, 1991)。人绒毛膜促性腺激素、人促黄体激素 (LH)、促卵泡素 (FSH) 和促甲状腺激素 (TSH) 等 4 种糖蛋白激素都是由非共价键结合的 α 亚基和特异性的 β 亚基组成, 利用 hCG β 亚基的抗体阻止 hCG 的活性, 可能达到抗生育的目的。近二十年来, 对于 hCG β 亚基蛋白避孕疫苗已做了较深入的研究, 并已开展了临床试验, 抗生育效果很好, 在试验的 1 224 生殖周期中只有 1 例受孕 (Talwar *et al.*, 1994), 但要作为避孕疫苗, 仍需解决免疫原性、佐剂、载体副作用及疫苗作用时间等许多复杂问题 (Stevens *et al.*, 1996)。

DNA 疫苗是九十年代发展起来的免疫新技术, 许多动物模型和人体实验都证明了 DNA 疫苗能激发有效的体液免疫应答和细胞免疫应答 (Wang *et al.*, 1993a; Wang *et al.*, 1993b)。目前, 针对艾滋病、肿瘤、癌症等疾病的 DNA 疫苗已进入临床试验阶段 (Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*,

1995)。

为探讨 hCG β 亚基 DNA 避孕疫苗的可能性, 我们选用恒河猴 (*Macaca mulatta*) 绒毛膜促性腺激素蛋白 β 亚基 (rmCG β) 全长氨基酸编码序列的 cDNA 片段来构建真核质粒表达载体 pCMV4-rmCG β , 以检测 DNA 避孕疫苗的免疫效应、抗生育作用和安全性问题。本文利用 HeLa 细胞体外瞬时表达系统, 采用 RT-PCR、ELISA 等方法检测 pCMV4-rmCG β 在 HeLa 细胞中的表达, 同时, 采用 ELISA 的方法检测 pCMV4-rmCG β 免疫接种小鼠后的体液免疫应答。

1 材料和方法

1.1 试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶等分子生物学试剂分别购自 Premga, BRL 等公司; DMEM 培养基、F12 培养基、FBS 和脂质体均购自 GIBCO 公司; OPD、磷酸和柠檬酸缓冲液和碳酸盐缓冲液购自 SIGMA 公司, 0.5% bupivacaine-HCl 购自 Astra 公司; hCG β 标准纯品及其单克隆抗体购自 Phamigen 公司; 兔抗人 hCG β 抗血清由中国科学院动物研究所内分泌室提供; 其余试剂均为分析纯、

2000-08-21 收到, 2000-11-10 修回

* 国家计划生育委员会“九五”攻关项目资助 (No. 96-904-01-02a)

** 通讯作者 E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn

第一作者简介 陈云, 博士研究生。研究方向: 生殖免疫与分子生物学。E-mail: chenyun@panda.ioz.ac.cn

优级纯。

1.2 实验动物

实验动物选用 6~8 周龄的雌性 BALB/c 纯系小鼠, 体重 18~22 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供。所有实验小鼠均按二级动物标准饲养。

1.3 真核质粒表达载体 pCMV4-rmCG β 的构建

根据灵长类绒毛膜促性腺激素 hCG (baboon)、hCG (human)、mCG (marmoset monkey) β 亚单位序列相似性分析设计出一对引物, 采用外科手术从妊娠 (3~4 月) 恒河猴体内取出胎盘, 提取总 RNA, 通过 TDRT-PCR (touch down RT-PCR) 方法得到一条特异扩增带, 测序分析确定为 rmCG β 的 cDNA 序列 (Chen *et al.* 另文发表, rmCG β 基因在 GeneBank 的编号: AY011015)。将 rmCG β 全长氨基酸编码序列的 cDNA 片段重组到 PCR⁺ 2.1 克隆质粒中, 再亚克隆至真核质粒表达载体 pCMV4 中, 构建成 pCMV4 rmCG β , 经酶切鉴定筛选正向插入的重组质粒 (见图 1)。

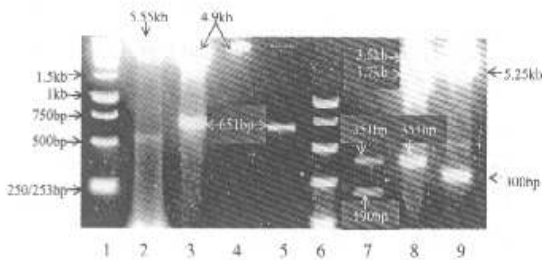


图 1 真核质粒表达载体 pCMV4-rmCG β 的构建及酶切鉴定

Fig. 1 Construction and analysis of the rec-pCMV4-rmCG β plasmid

- 1: 1 kb DNA 标准 (1 kb DNA ladder marker)
- 2: 重组表达质粒 pCMV4-rmCG β (Recombinant expression plasmid pCMV4-rmCG β)
- 3: 重组表达质粒 pCMV4-rmCG β 被 *Hind* III/*Xba* I 双酶切 (Recombinant expression pCMV4 rmCG β digested by *Hind* III/*Xba* I)
- 4: 质粒 pCMV4 被 *Hind* III/*Xba* I 双酶切 (Plasmid pCMV4 digested by *Hind* III/*Xba* I)
- 5: 重组克隆质粒 PCR 2.1-rmCG β 被 *Hind* III/*Xba* I 双酶切 (Recombinant clone vector digested by *Hind* III/*Xba* I)
- 6: PCR DNA 标准 (PCR marker: 1000, 750, 500, 300, 150 and 50bp)
- 7: rmCG β cDNA 被 *Nae* I 酶切 (rmCG β cDNA digested by *Nae* I)
- 8~9: 重组表达质粒 pCMV4-rmCG β 分别被 *Nae* I/*Xba* I 和 *Pst* I/*Xba* I 双酶切 (pCMV4-rmCG β digested by *Nae* I/*Xba* I and *Pst* I/*Xba* I)

1.4 外源 rmCG β 基因的体外表达和表达含量的鉴定

建立 HeLa 细胞体外瞬时表达系统, 真核表达质粒 pCMV4-rmCG β 经脂质体转染到培养在 24 孔板的 HeLa 细胞中, 分别于 24 h、48 h 和 72 h 收集培养液及细胞, 采用 RT-PCR 和 ELISA 分析鉴定 rmCG β 基因的体外表达及含量。

1.4.1 rmCG β 在 mRNA 水平上的表达: 提取 pCMV4-rmCG β 转染 HeLa 细胞后不同时间收集的细胞的总 RNA, 定量 1 μ g 总 RNA, 利用扩增 rmCG β 的 cDNA 序列时采用的引物及 TDRT-PCR 方法, 扩增 cDNA 条带, 经光密度扫描处理后比较不同时间收集细胞的 rmCG β 在 mRNA 水平上的表达。

1.4.2 rmCG β 在蛋白水平上的表达: 采用双夹心抗体 ELISA 方法检测 rmCG β 在蛋白水平上的表达, 方法如下: 96 孔酶标板用 1:1 000 (500 ng/ml) 抗 hCG β 单克隆抗体 50 μ l/孔包被, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 弃去包被液 PBST 洗板 3 次, 3% BSA-PBST 在 37 $^{\circ}$ C 封闭非特异性位点 1 h; 洗板, 然后加入转染 HeLa 细胞后不同时间收集的培养液及细胞裂解液 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 洗板后, 加入 1:500 稀释度的兔抗 hCG β 抗血清 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 洗板后, 再加入 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (IgG-HRP) 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗 3 次, 加入 OPD100 μ l, 室温避光显色反应 30 min, 用 2 mol/L 硫酸中止反应, 用酶标仪测定 490 nm OD 值。同时以 hCG β 为抗原和抗 hCG β 单克隆抗体反应制备标准曲线图。按照样品 OD₄₉₀ 与对照 OD₄₉₀ 的差值对应相应 OD₄₉₀ 标准曲线浓度, 再乘以样品的体积来计算出 rmCG β 基因表达的蛋白含量 (以免疫反应中等价的 hCG β 抗原浓度为单位)。

1.5 实验动物处理

将小鼠随机分为 3 组, 每组 4 只。实验组 1: 注射 100 μ g 质粒 DNA; 实验组 2: 注射 50 μ g 质粒 DNA; 实验组 3: 注射 10 μ g 质粒 DNA。每只小鼠接种质粒 DNA 前 24 h, 在右侧大腿肌肉处分 3 点注射 50 μ l 0.5% bupivacaine-HCl, 然后在相同部位分 3 次注射质粒 DNA, 并在 2 周后加强免疫一次。在注射质粒 DNA 前和注射质粒 DNA 后 2 周、4 周、6 周和 10 周, 用玻璃毛细管自小鼠眼球后上眶眼静脉取血 200~300 μ l, 收集血清, 20 $^{\circ}$ C 保存。用 ELISA 方法检测抗体水平的动态变化。

1.6 ELISA 检测体液免疫反应

用 50 倍稀释的正常血清作为对照。收集的实验动物血清按 1:100 和 1:1 000 的比例稀释,以 1 μ g/mL 的 hCG β 标准蛋白 50 μ l/孔作包被抗原,采用标准 ELISA 方法检测体液免疫应答的情况,抗体滴度判定:1 / (样品血清的 OD₄₉₀ 值与对照血清 OD₄₉₀ 值之差的数值 \times 样品稀释比例),当样品血清的 OD₄₉₀ 值与对照血清 OD₄₉₀ 值的差值小于 0.1 时判为无效,差值大于 1.0 时则需更大倍数稀释。免疫反应曲线以抗体滴度值的 log₁₀ 表示(如:在 1 000 的稀释比例条件下,OD₄₉₀ (sample) - OD₄₉₀ (control) = 0.1, 则该样品抗体滴度值为 1 000, 则反应曲线值为 log₁₀^{1 000} = 3)(Kerr *et al.*, 1999)。

1.7 统计处理

文中所有数据统计处理均采用 *t*-检验 (student *t*-test)。

2 实验结果

2.1 pCMV4-rmCG β 的体外表达和表达量

提取不同时间收集的转染 HeLa 细胞的总 RNA,定量 1 μ g 通过 RT-PCR 方法扩增出 rmCG β cDNA 条带,经限制性内切酶 *Nae* I 酶切鉴定确定为 rmCG β cDNA 序列(见图 2:A)。经光密度扫描处理后比较在 mRNA 水平上的表达情况。pCMV4-rmCG β DNA 转染入 HeLa 细胞后,在 24 h 时表达最强,在 48 h、72 h 表达依次减弱,与对照组相比有显著性差异(见图 2:B)。

双夹心抗体 ELISA 方法测得 pCMV4-rmCG β 在 HeLa 细胞中含量达每 10⁶ 细胞含 0.5 μ g hCG β 反应单位,而不同时间收集的培养液的 rmCG β 蛋白的含量皆无变化,表明 pCMV4-rmCG β 表达的 rmCG β 蛋白主要以细胞内的形式或膜结合的形式存在(见图 3)。另外,从图 2、3 可以看出 HeLa 细胞自身也有低水平的 CG β 蛋白表达。

2.2 pCMV4-rmCG β 诱导 BALB/c 小鼠产生体液免疫反应

通过普鲁卡因盐酸盐 (bupivacaine HCl) 药物诱导法,经 pCMV4-rmCG β DNA 免疫接种 BALB/c 小鼠,100 μ g、50 μ g 和 10 μ g 3 个实验组均能诱导小鼠产生强烈的体液免疫应答。从检测的第 2 周开始,免疫反应的滴度持续升高,滴度最高可达 6 000 以上,到目前为止,免疫反应已持续 10 周以上(见图 4)。3 个实验组的免疫反应强度和趋势一

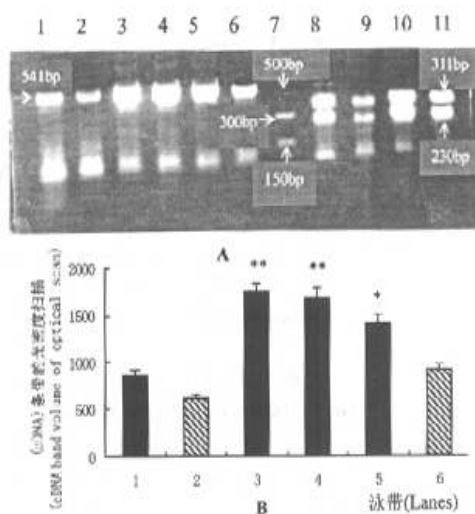


图 2 用 RT-PCR 方法检测重组表达质粒 pCMV4-rmCG β 在 HeLa 细胞中的表达

Fig. 2 Determination of rmCG β mRNA expression using RT-PCR in HeLa cells transfected with recombinant expression plasmid pCMV4-rmCG β vector

- A. rmCG β mRNA 的表达及酶切鉴定 (The expression and restriction enzyme digestion of rmCG β mRNA)
- 1: 恒河猴 rmCG β mRNA 的表达 (rmCG β mRNA expressed by Rhesus monkey)
 - 2: 正常 HeLa 细胞 CG β mRNA 的表达 (rmCG β mRNA expressed by normal HeLa cells)
 - 3-5: HeLa 细胞 CG β mRNA 在转染 pCMV4-rmCG β 质粒后 24 h, 48 h 和 72 h 的表达 (rmCG β mRNA expressed by HeLa cells transfected with pCMV4-rmCG β at 24 h, 48 h and 72 h)
 - 6: HeLa 细胞 CG β mRNA 在转染脂质体对照后 24 h 的表达 (CG β mRNA expressed by HeLa cells transfected with Lipid at 24 h)
 - 7: PCR DNA 标准 (PCR marker)
 - 8-11: 泳带 1、2、3 和 6 的 *Pst* I 酶切鉴定 (cDNA bands digested by *Pst* I from lane 1, 2, 3 and 6)
- B. 与 A 中 1-6 泳带的光密度扫描值比较, 星号代表显著性差异 (*t*-检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) [The comparison of image volume of TDRT-PCR bands. 1-6 are the data of image volume of lane 1-lane 6 from Fig. 2; A (Asterisks indicate significant differences (Student *t*-test, * $P < 0.05$ compared to control, ** $P < 0.01$)]

致,表明注射剂量在 10 μ g 至 100 μ g 之间, pCMV4-rmCG β DNA 接种小鼠诱发的免疫反应强度与 pCMV4-rmCG β DNA 无剂量依赖关系。

3 讨论

DNA 免疫技术虽然是新兴的基因治疗新技

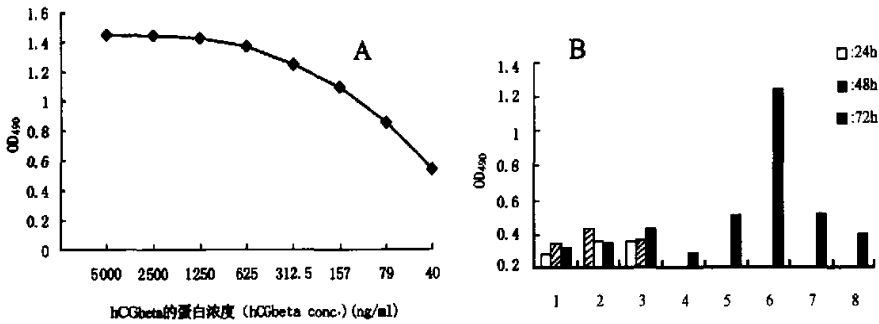


图 3 用 ELISA 方法检测重组表达质粒 pCMV4-rmCGβ 在 HeLa 细胞中的表达

Fig.3 Determination of rmCGβ protein expression using ELISA in HeLa cells transfected with recombinant expression plasmid pCMV4-rmCGβ vector

- A. 以 hCGβ 为抗原, 采用抗 hCGβ 单克隆抗体制备的标准曲线图 (The standard immuno-reaction curve of between hCGβ antigen and mouse anti- hCGβ monoclonal antibody, the hCGβ concentration from 5 000 ng/mL to 40 ng/mL)
- B. ELISA 检测样品的 OD490 读值 (The OD490 value of ELISA)
- 1: 转染脂质体对照的 HeLa 细胞培养液 (Medium with Lipid control)
 - 2: 采用脂质体转染重组表达质粒 pCMV4-rmCGβ 的 HeLa 细胞培养液 (Medium transfected with pCMV4-rmCGβ plasmid DNA using Lipid)
 - 3: 转染 pCMV4-rmCGβ 质粒 DNA 对照的 HeLa 细胞培养液 (Medium with pCMV4-rmCGβ plasmid DNA control)
 - 4: HeLa 细胞的正常培养液 (Normal medium)
 - 5: 转染脂质体对照的 HeLa 细胞 (HeLa cells with Lipid control)
 - 6: 采用脂质体转染重组表达质粒 pCMV4-rmCGβ 的 HeLa 细胞 (HeLa cellstransfected with pCMV4-rmCGβ plasmid DNA using Lipid)
 - 7: 转染 pCMV4-rmCGβ 质粒 DNA 对照的 HeLa 细胞培养液 (HeLa cellstransfected with pCMV4-rmCGβ plasmid DNA control)
 - 8: 正常 HeLa 细胞 (Normal HeLa cells)

术, 由于 DNA 疫苗具有性质稳定, 表达的抗原其分子构象与天然分子构象一致, 免疫效力高, 同时激发体液免疫和细胞免疫, 免疫期长, 制作、使用简便等潜在的优点, 已引起了广泛的重视 (Wang *et al.*, 1995)。由于 hCGβ 蛋白的免疫原性较差, 必须与相应载体偶联才能激发体液免疫, 产生高水平抗 hCGβ 的抗体去中和妊娠母体中的 hCG, 方能达到避孕的效果。目前研究表明 hCGβ 蛋白避孕疫苗不存在由 T 细胞介导的细胞毒性作用, hCGβ 蛋白疫苗的免疫作用主要依赖体液免疫起作用, 需要进行免疫方法的改进以利于 hCGβ 蛋白疫苗的应用 (Dirnhofer *et al.*, 1993; Dirnhofer *et al.*, 1994)。因此探讨 hCGβ DNA 疫苗也成为研究避孕疫苗的新途径 (Zhang *et al.*, 1999)。

在前期工作中我们分析 rmCGβ 与 hCGβ 的同源性时发现它们在 cDNA 水平上的同源性高达 90.6%, 在蛋白水平上的同源性达 79.5% (Chen *et al.*, 2001), Sumdaram 等 (1976) 和 Zhou 等 (1992) 亦曾先后报道 rmCG 和 hCG 存在明显的免

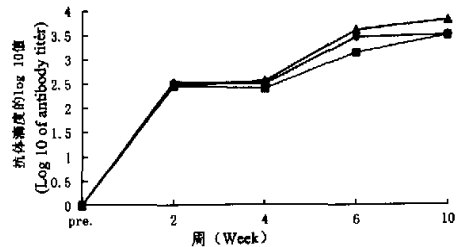


图 4 用 ELISA 检测通过药物诱导法免疫接种重组表达质粒 pCMV4-rmCGβ 后小鼠的体液免疫应答

Fig.4 The humoral immune responses of BALB/c mice immunized with recombinant expression plasmid pCMV4-rmCGβ vector

- ▲ - : 注射 100 μg pCMV4-rmCGβ 质粒 DNA 组 (Group inoculated with 100 μg pCMV4-rmCGβ vector)
 - ■ - : 注射 50 μg pCMV4-rmCGβ 质粒 DNA 组 (Group inoculated with 50 μg pCMV4-rmCGβ vector)
 - □ - : 注射 10 μg pCMV4-rmCGβ 质粒 DNA 组 (Group inoculated with 10 μg pCMV4-rmCGβ vector)
- Pre.: 免疫前 (Pre-immunization) 2、4、6、8 和 10: 免疫后第 2、4、6、8 和 10 周 (At 2, 4, 6 and 10 week post immunization)

疫交叉反应。因此,研究 pCMV4-rmCG β DNA 疫苗的免疫效应、抗生育作用和安全性问题可以为 hCG β 亚基 DNA 避孕疫苗的研究提供重要的参考。本文检测了 pCMV4-rmCG β 在 HeLa 细胞中表达的情况,并进一步检测了通过药物诱导法免疫接种小鼠后的体液免疫应答情况。研究结果表明:构建的真核质粒表达载体 pCMV4-rmCG β 能在 HeLa 细胞

中高强度表达,表达的 rmCG β 蛋白主要以细胞内或膜结合的形式存在,将质粒 pCMV4-rmCG β DNA 通过药物诱导后接种小鼠肌肉,小鼠骨髓肌细胞能够吸收质粒 DNA,并表达编码的 rmCG β 蛋白抗原,表达的 rmCG β 被小鼠的免疫系统识别,产生抗 rmCG β 的抗体。这为进一步研究避孕 DNA 疫苗抗生育作用和安全性问题奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

- Chen, Y., Z. Liu, B. Wang and J. P. Peng 2001 Identification of beta subunit of the Rhesus monkey chorionic gonadotropin (rmCG). *Mol. Cell Biochem.* **218**: 157~163.
- Darrell, N. W. 1991 Gonadotropins, In: Darrell, N. W., R. B. George and H. M. Katherine ed. *Reproduction in Domestic Animals*. Fourth Edition, San Diego: Academic press Inc., 25~80.
- Dirhofer, S., J.-M. B. Madersbacher, P. B. W. Ten Kortenaar, G. Spottl, K. Mann, G. Wick and P. Berger 1994 The molecular basis for epitopes on the free β -subunit of human chorionic gonadotropin (hCG), its carboxyl-terminal peptide and the hCG β -core fragment. *J. Endocrin.* **141**: 153~162.
- Dirhofer, S., R. Klieber, R. De Leeuw, J. M. Bidart, W. E. Merz, G. Wick and P. Berger 1993 Functional and immunological relevance of the COOH-terminal extension of human chorionic gonadotropin β : implications for the WHO birth control vaccine. *The FASEB J.* **7** (14): 1381~1385.
- Kerr, P. J., R. J. Jackson, A. J. Robinson, J. Swan, L. Silvers, N. French, H. Clarke, D. F. Hall and M. K. Holland 1999 Infertility in female Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) Alloimmunized with the Rabbit Zona Pellucida protein ZPB either as a purified recombinant protein or expressed by recombinant Myxoma virus. *Bio. Reprod.* **61**: 606~613.
- Morgan, F. J., S. Birken and R. E. Canfield 1975 The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. *J. Bio. Chem.* **250**: 5248~5258.
- Stevens, V. C. 1996 Progress in the development of human chorionic gonadotropin antifertility vaccines. *Am. J. Re prod. Immunol.* **35** (3): 148~155.
- Sundaram, K., C. C. Chang, K. A. Laurence, A. O. Brinson, L. E. Atkinson and S. J. Segal 1976 The effectiveness in rhesus monkeys of an antifertility vaccine based on neutralization of chorionic gonadotropin. *Contraception* **14** (6): 639~653.
- Talwar, G. P., O. Singh, R. Pal, N. Chatterjee, P. Sahai, K. Dhali, J. Kaur, S. K. Das, S. Suri and K. Buckshee 1994 A vaccine that prevents pregnancy in women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (18): 8532~8536.
- Wang, B., J. Boyer, V. Srikantan, L. Coney, R. Carrano, C. Phan, M. Merva, K. Dang, M. G. Agadjanyan, L. Gilbert, K. Ugen, W. V. Williams and D. B. Weiner 1993a DNA inoculation induces neutralizing immune responses against HIV-1 in mice and nonhuman primates. *DNA and Cell Biology* **12**: 799~805.
- Wang, B., K. Ugen, V. Srikantan, M. Agadjanyan, K. Dang, Y. Fefaeli, A. I. Sato, J. Boyer, W. V. Williams and D. B. Weiner 1993b DNA inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 4156~4160.
- Wang, B., J. Boyer, V. Srikantan, K. E. Ugen, L. Gilbert, C. Phan, K. Dang, M. Merva, M. G. Agadjanyan, M. Newman, R. Carrano, D. McCallus, L. Coney, W. V. Williams and D. B. Weiner 1994 Induction of humoral and cellular immune responses to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by *in vivo* DNA inoculation. *Virology* **211**: 102~112.
- Wang, B., M. Merva, K. Dang, K. E. Ugen, W. V. Williams and D. B. Weiner 1995 Immunization by DNA inoculation induces tumor rejection. *Hum. Gene Ther.* **6**: 407~418.
- Wang, B. 1995 The development and practice of DNA vaccine. *Pro. in Bioengineering.* **15** (6): 21~23. [王 宾 1995 DNA 疫苗的发展与应用. *生物工程进展* **15** (6): 21~23.]
- Zhang, F. C., N. Wang, D. M. Liu, Y. L. Jian, Y. Z. Chen, X. Z. Shen, Y. Q. Cao and B. Wang 1999 Development of female contraceptive vaccine through DNA inoculation of human chorionic gonadotropin beta subunit (hCG β). In: D. B. Lowrie and R. G. Whalen ed. *DNA vaccines: Methods and Protocols*. Totowa N. J.: Humana Press Inc., 439~449.
- Zhou, C. K., F. Z. Ye, Z. X. Li, S. Q. Tu and B. Zhou 1992 Immunological cross-reactivity between rhesus monkey chorionic gonadotropin and human chorionic gonadotropin. In: *The Memoir of National First Immunology of Reproduction*, 16. [周昌奎, 叶凤珠, 李志峰, 涂书清, 周 奔 1992 恒河猴 CG 与 hCG 免疫交叉反应. 见: 第一届全国生殖免疫学大会论文集, 16.]

外 文 摘 要 (Abstract)

**EXPRESSION OF BETA SUBUNIT OF RHESUS MONKEY
CHORIONIC GONADOTROPIN (rmCG β) DNA
IN HeLa CELLS AND THE IMMUNE RESPONSES IN BALB/C MOUSE
INOCULATED BY rmCG β DNA VACCINE**

CHEN Yun LIU Zhe PENG Jing-Pian
ZHANG Fu-Chun CHEN You-Zhen WANG Bin

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

The human chorionic gonadotropin (hCG) as one of glycoprotein hormones family shares a common alpha subunit but differs in the hormone-specific beta subunit. Because of the physiological and temporal specificity, the hCG β is a good target molecular to develop immuno-contraceptives. To study the feasibility of human DNA immuno-contraceptive by using hCG β gene, the Rhesus monkey was chosen as an *in vitro* and *in vivo* model to understand the immune response, anti-fertility effect and safety of β -CG DNA immuno-contraceptive. pCMV4-rmCG β , a kind of DNA vaccine inserted with full-coding cDNA sequence of beta subunit of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) chorionic gonadotropin (rmCG β), was constructed to understand the feasibility of developing human DNA immuno-contraceptive. In this work, the full-coding cDNA sequence of rmCG β was inserted into eukaryotic expression vector pCMV4 to construct recombinant expression vector pCMV4-rmCG β . Using HeLa cells transient expression system, the capability of expression of pCMV4-rmCG β was detected *in vitro*, in which the mRNA and the protein of rmCG β expressed in HeLa cells were determined by RT-PCR and ELISA, respectively. The pCMV4-rmCG β DNA were transfected into HeLa cells with lipid, and the culture sera and cells were collected at 24 h, 48 h, and 72 h after transfection. The results showed that there was the highest level expression of rmCG β at 24 h after transfection at mRNA level, and the expression was gradually decreased from 48 h to 72 h. The mRNA expression of treatment assay showed significant difference compare to untreated HeLa cells and Lipofectamine Lipid control assay ($P < 0.05$). At protein level, the highest level expression of rmCG β reached 0.5 μg (equivalent to hCG β) / 10^6 cells, and the rmCG β protein was mainly with intracellular or membrane associated state. To detect the ability of biological function of pCMV4-rmCG β plasmid DNA *in vivo*, the female BALB/c mice were inoculated with pCMV4-rmCG β plasmid DNA from 10 μg to 100 μg with intramuscular inoculation method. The sera samples were collected at 2 week, 4 week, 6 week, and 10 week post-immunization. The results of ELISA showed that the intensive humoral immune responses in female BALB/c mice were elicited by inoculating pCMV4-rmCG β DNA vaccine. The highest level of antibody titer was above 6 000. These intensive immune responses were no dose-dependent on the quantity of pCMV4-rmCG β DNA from 10 μg to 100 μg , and could last at least 10 weeks. The results indicate that the recombinant pCMV4-rmCG β eukaryotic expression vector has biological function, which can express rmCG β -subunit *in vitro* cells and *in vivo* tissue. Moreover, the rmCG β protein could be expressed by the muscle of BALB/c mice and presented by the Antigen Present Cells to induce intensive humoral immune responses. In brief, This work establishes the base for further anti-fertility and safety detection of pCMV4-rmCG β DNA vaccine, and should be valuable in developing CG β DNA immuno-contraceptive.

Key words Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), rmCG β , DNA vaccine, HeLa cells, Expression, Immunization